

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

10/009629



REC'D 09 AUG 2000

EP 00/5258  
4Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

28/12

**Aktenzeichen:** 199 27 571.8

**Anmeldetag:** 17. Juni 1999

**Anmelder/Inhaber:** BASF Aktiengesellschaft,  
Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit  
erhöhtem Gehalt an Flavonoiden und pheno-  
lischen Inhaltsstoffen

**IPC:** A 01 N 37/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt

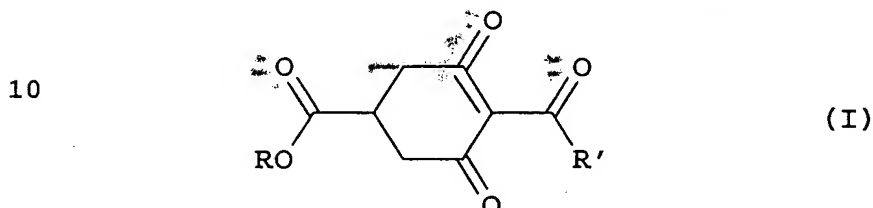
Der Präsident  
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENTCERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

Hiebinger

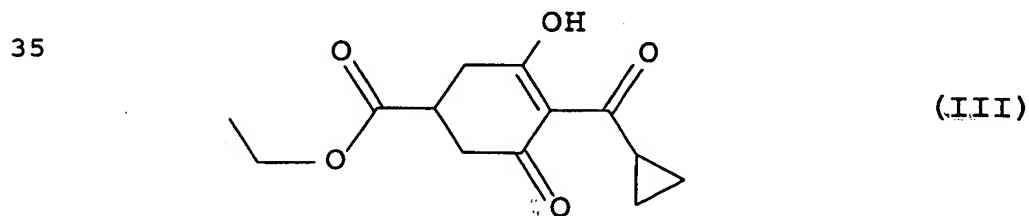
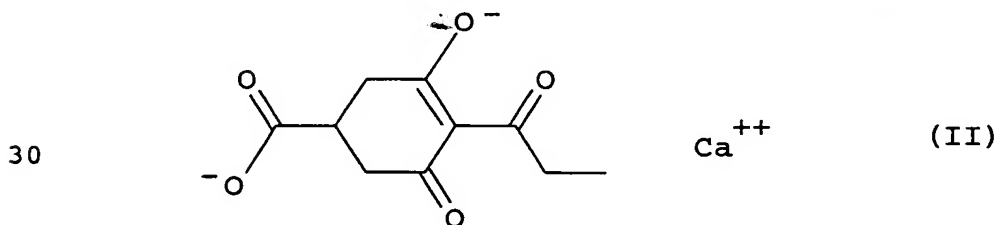
Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und  
 5 phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet,  
~~net, daß die Pflanzen mit wachstumsregulierenden Acylcyclohex-~~  
~~adionen der Formel I behandelt werden,~~



- 15 wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-,  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Haloalkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe  
 (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff,  
 eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert  
 oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienyl-  
 20 methyl-, Alkoxyethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie  
 geeignete Salze dieser Verbindungen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Erhöhung durch Be-  
 handlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(I) und/  
 25 oder Trinexapac-ethyl(II) hervorgerufen werden.



## 2

3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Pflanzen um Weinreben, Kirschen, Pflaumen, Schlehen, Blaubeeren, Erdbeeren, Zitrusfrüchten (wie Orangen, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, *Aronia melanocarpa*, *Ginkgo biloba* handelt.
- 10 4. Verwendung von Pflanzen gemäß Anspruch 3 oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellten Produkten (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.
- 15 5. Mittel, hergestellt nach Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder
- 20 Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.
- 25 6. Mittel gemäß Anspruch 5, bei denen es sich um Trauben oder Traubenteilen, aus ihnen gewonnene Säfte, Weine oder Preßrückstände handelt oder um Extrakte aus den vorgenannten Trauben, Traubenteilen oder Traubenprodukten.

30

35

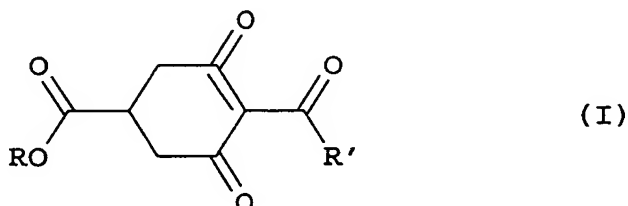
40

45

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen

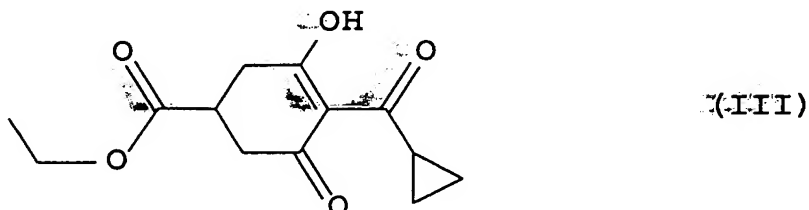
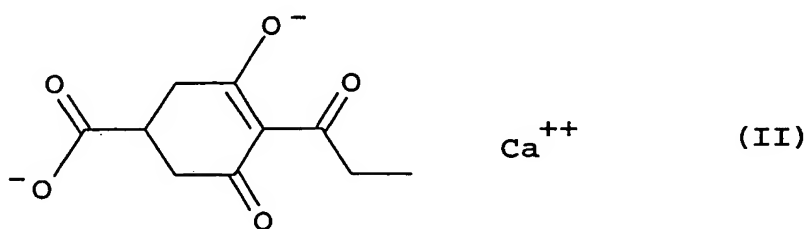
## 5 Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze mit  
10 wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen der Formel I behandelt werden,



wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-,  
20 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Haloalkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienylmethyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete  
25 Salze dieser Verbindungen.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Erhöhung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(I) und/oder Trinexapac-ethyl(II) hervorgerufen werden.



45 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Acylcyclohexadionen der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder mit Trinexapac-

ethyl behandelt wurden oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mittel, hergestellt nach den erfindungsgemäßen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.

Verschiedene phenolische Substanzen (Phenylpropanoide) kommen in Pflanzen vor, z. B. Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, Gallussäure, Eugenol, Lignane, Cumarine, Lignin, Stilbene (Polydatin, Resveratrol), Flavonoide (Flavone, Catechine, Flavanone, Anthocyanidine, Isoflavone), polymethoxylierte Flavone. Demgemäß sind Phenole auch genereller Bestandteil vieler pflanzlicher Nahrungs- und Genußmittel. Bestimmte phenolische Substanzen sind von besonderer Bedeutung, da sie nach Aufnahme mit der Nahrung im menschlichen oder tierischen Stoffwechsel eine antioxidative Wirkung ausüben können (Baum, B. O.; Perun, A. L. Antioxidant efficiency versus structure. *Soc. Plast. Engrs Trans* 2: 250-257, (1962); Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Duthie, G.G. Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J. Sci. Food Agric.* 76: 257-262, (1997); Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Pananga, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956, (1996); Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. Polyphenolic flavonoids as scavenger of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339-346, (1995); Stryer, L. *Biochemistry* S. Francisco: Freeman, (1975); Vieira, O.; Escargueil-Blanc, I.; Meilhac, O.; Basile, J. P.; Laranjinha, J.; Almeida, L.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 123: 565-573, (1998)). Darüber hinaus haben Polyphenole vielfältige Wirkungen auf den Zellstoffwechsel. Unter anderem werden Enzyme der Signaltransduction wie Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase und Phosphatidylinositol-3-kinase moduliert (Agullo, G.; Gamet-payrastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Remesy, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a compari-

- son with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53 :1649-1657, (1997); Ferriola, P. C.; Cody, V.; Middleton, E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure activity relationship. *Biochem Pharmacol* 38: 1617-1624, (1989); Cushman, M.; Nagarathman, D.; Burg, D. L.; Geahlen, R. L. Synthesis and protein tyrosine kinase inhibitory activity of flavonoid analogues. *J Med Chem* 34: 798-806, (1991); Hagiwara, M.; Inoue, S.; Tanaka, T.; Nunoki, K.; Ito, M.; Hidaka, H. Differential effects of flavonoids as
- 10 inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem Pharmacol* 37: 2987-2992, (1988)), -die induzierbare NO-Synthase downreguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage
- 15 cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53: 897-903, (1997)) und die Genexpression von z. B. Interleukinen und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) reguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell
- 20 line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53: 897-903, (1997); Wolle, J.; Hill, R. R.; Ferguson, E.; Devall, L. J.; Trivedi, B. K.; Newton, R. S.; Saxena, U. Selective inhibition of tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcriptional factor NF- $\kappa$ B.
- 25 *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 16: 1501-1508, (1996)). Es gilt als gesichert, daß diese Wirkungen positiv sind zur Prävention von Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes, verschiedener Tumorarten und weiterer chronischer Krankheiten (Bertuglia, S.; Malandrino, S.; Colantuoni, A. Effects of the natural flavonoid delphinidin
- 30 on diabetic microangiopathy. *Arznei-Forsch/Drug Res* 45: 481-485, (1995); Griffiths, K.; Adlercreutz, H.; Boyle, P.; Denis, L.; Nicholson, R. I.; Morton, M. S. *Nutrition and Cancer* Oxford: Isis Medical Media, (1996); Hertog, M. G. L.; Fesrens, E. J. M.; Hollman, P. C. K.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant
- 35 flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342: 1007-1011, (1993); Kapiotis, S.; Hermann, M.; Held, I.; Seelos, C.; Ehringer, H.; Gmeiner, B. M. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-74, (1997); Stampfer, M. J.; Hennekens, C. H.; Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Rosner, B.; Willet, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New Engl J Med* 328 :1444-1449, (1993); Tijburg, L. B. M.; Mattern, T.; Folts, J. D.; Weisgerber,
- 45 U. M.; Katan, M. B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 771-785, (1997); Kirk, E. A.; Sutherland, P.; Wang, S. A.; Chait, A.; LeBoeuf, R. C. Dietary

- isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128: 954-9, (1998)). Aus geeigneten Pflanzen wird daher bereits eine Reihe von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln gewonnen, deren Wirkung auf ihrem Gehalt an phenolischen Substanzen beruht (Gerritsen, M. E.; Carley, W. W.; Ranges, G. E.; Shen, C. P.; Phan, S. A.; Ligon, G. F.; Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278-292, (1995); Lin, J. K.; Chen, Y. C.; Huang, Y. T.; Lin-Shiau, S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 28-29:39-48, 1997; Zi, X.; Mukhtar, H.; Agarwal, R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. *Biochem Biophys Res Comm* 239:334-339, 1997). Bekannt ist weiterhin, daß bestimmte pflanzliche Nahrungsmittel oder aus ihnen hergestellte Genußmittel eine positive Wirkung gegen verschiedene Krankheiten ausüben. Das in Weißwein, besonders aber in Rotwein, enthaltene Resveratrol (nebst weiterer Komponenten) wirkt beispielsweise gegen kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Gehm, B.D.; McAndrews, J.M.; Chien, P.-Y.; Jameson, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143, (1997); Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehtha, R.G.; Moon, R.C., Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, (1997)). Eine ähnliche Wirkung weisen auch Substanzen wie Catechin, Epicatechin-3-gallat, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-gallat auf, die in Blättern von Tee (*Camellia sinensis*) vorkommen. Insbesondere aus nicht-fermentierten Teeblättern (Grüner Tee) hergestellte Getränke sind von positiver gesundheitlicher Relevanz (Hu, G.; Han, C.; Chen, J. Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallocatechin gallate in mice. *Nutr Cancer* 24: 203-209; (1995); Scholz, E; Bertram, B. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Der Teestrauch. *Z. Phytotherapie* 17: 235-250, (1995); Yu, R.; Jiao, J. J.; Duh, J. L.; Gudehithlu, K.; Tan, T. H.; Kong, A. N. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant responsive elements-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 18: 451-456, (1997); Jankun, J.; Selman, S.H.; Swiercz, R. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387: 561, (1997)). Darüber hinaus weisen auch polymethoxylierte Flavone aus Zitrusfrüchten eine potentielle antitumorale Wirkung auf (Chem,

J.; Montanari, A.M.; Widmer, W.W. Two new polymethoxylierte flavone, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids. *J Agric Food Chem* 45: 364-368, (1997)).

5

- Acylcyclohexandione wie Prohexadion-Ca und Trinexapac-ethyl (ältere Bezeichnung: Gimectacarb) werden als Bioregulatoren zur Hemmung des pflanzlichen Längenwachstums eingesetzt. Ihre bioregulatorische Wirkung kommt dadurch zustande, daß sie die Biosynthese von Längenwachstumsfördernden Gibberellinen blockieren. Dabei hemmen sie aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu 2-Oxoglutarsäure bestimmte Dioxygenasen, die 2-Oxoglutarsäure als Co-Substrat benötigen (Rademacher, W, Biochemical effects of plant growth retardants, in: Plant Biochemical Regulators, Gausman, HW (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-200 (1991)). Es ist bekannt, daß derartige Verbindungen auch in den Stoffwechsel von Phenolen eingreifen und so bei mehreren Pflanzenarten eine Hemmung der Anthocyanbildung bewirken können (Rademacher, W et al., The mode of action of acylcyclohexanediones - a new type of growth retardant, in: Progress in Plant Growth Regulation, Karssen, CM, van Loon, LC, Vreugdenhil, D (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992)). Derartige Effekte auf den Haushalt phenolischer Inhaltsstoffe werden als ursächlich für die Nebenwirkung von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand angegeben (Rademacher, W et al., Prohexadione-Ca - a new plant growth regulator for apple with interesting biochemical features, Poster auf dem 25th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, 7.-10. Juli 1998, Chicago). A. Lux-Endrich (Dissertation Technische Universität München in Weihenstephan, 1998) findet im Verlauf ihrer Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand, daß es in Zellkulturen von Apfel durch Prohexadion-Ca zu einer mehrfachen Erhöhung des Gehaltes an phenolischen Substanzen kommt und daß dabei eine Reihe von sonst nicht vorhandenen Phenolen auftritt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde weiterhin gefunden, daß unter dem Einfluß von Prohexadion-Ca relativ hohe Mengen von Luteoliflavan und Eriodyctiol in Sproßgewebe von Apfel auftreten. Luteoliflavan kommt in Apfelgewebe normalerweise nicht vor und Eriodyctiol tritt als Intermediat des Flavonoidstoffwechsels nur in geringen Mengen auf. Die zu erwartenden Flavonoide Catechin und Cyanidin waren im behandelten Gewebe jedoch nicht nachweisbar oder traten nur in deutlich reduzierten Mengen auf (S. Römmelt et al, Vortrag 8th International Workshop on Fire Blight, Kusadasi, Türkei, 12.-15. Oktober 1998).

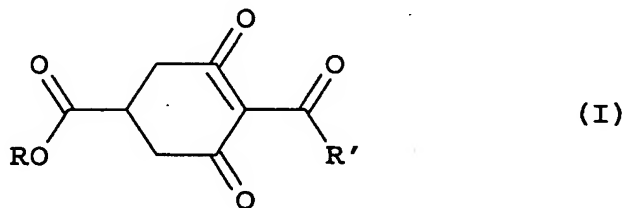


Es kann als gesichert gelten, daß Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und andere Acylcyclohexandione 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen inhibieren, die im Stoffwechsel phenolischer Substanzen von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich primär um Chalcon synthetase (CHS) und um Flavanon-3-hydroxylase (F3H) (W. Heller und G. Forkmann, Biosynthesis, in: The Flavonoids, Harborne, JB (ed.), Chapman and Hall, New York, 1988). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Acylcyclohexandione auch weitere, bislang unbekannte, 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen hemmen. Es dürfte ferner naheliegend sein, daß ein Mangel an Catechin, Cyanidin oder anderen Endprodukten der Flavonoid-synthese von der Pflanze registriert wird und daß über einen Feedback-Mechanismus die Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) erhöht wird. Durch die weiterhin existierende Hemmung von CHS und F3H können diese Flavonoid-Endprodukte jedoch nicht gebildet werden, und es kommt zu einer vermehrten Bildung von Luteoliflavan, Eriodyctiol und anderer Phenole (Abbildung 1).

Aufgabe der Erfindung war es ein kostengünstiges, einfaches Verfahren zu entwickeln, um den Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen in Pflanzen zu erhöhen und um deren gesundheitsfördernde Eigenschaften zu verbessern.

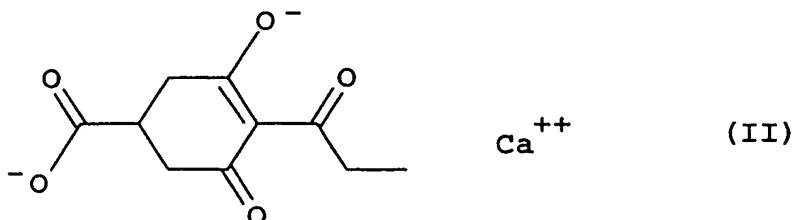
Die Aufgabe konnte überraschenderweise durch Behandlung der Pflanzen mit den wachstumsregulierenden Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexandione(I)

30



und vor allem mit den Verbindungen Prohexadion-Ca(II)

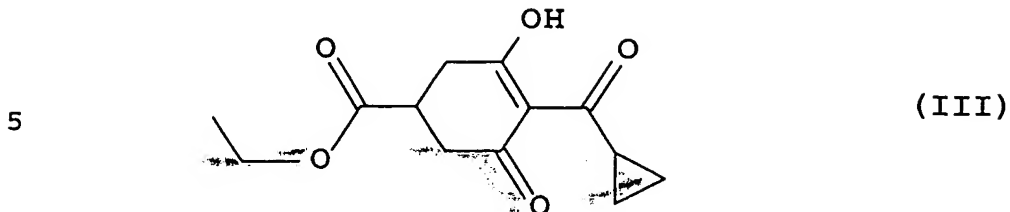
40



45

7

und Trihexapac-ethyl(III)



erreicht werden.

10

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) können die Flavonoide Eriodictyol, Proanthocyanidine, die am C-Atom 3 mit Wasserstoff substituiert sind, z.B. Luteoforol, Luteoliflavan, Apigeniflavan und Tricetiflavan, sowie homogene und heterogene Oligomere und Polymere aus den genannten und strukturell verwandten Substanzen vermehrt gebildet werden.

Erhöhte Konzentrationen der Phenole Hydroxyzimtsäuren (p-Cumarsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Salicylsäure oder Umbelliferon, einschließlich der aus ihnen gebildeten homogenen und heterogenen Oligomere und Polymere können nach Applikation der Verbindungen Acylcyclohexadionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trihexapac-ethyl(III) auf Pflanzen festgestellt werden.

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadionen der Formel I, Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) wird auch die Konzentration der Glykoside der Flavonoide, der phenolischen Verbindungen, der Chalone und der Stilbene in den Pflanzen erhöht.

Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und verwandte Verbindungen greifen auch in weitere Stoffwechselreaktionen ein, bei denen bislang allenfalls vermutet werden kann, daß 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen beteiligt sind.

Als weitere zusätzlich positive Wirkung bei der Gewinnung von Präparaten aus höheren Pflanzen mit verbesserter heilender, gesundheitsfördernder oder stärkender Wirkung ist zu vermerken, daß sich aufgrund der wachstumsregulierenden Wirkung von Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl oder verwandter Acylcyclohexandione ein Konzentrierungseffekt der relevanten Inhaltsstoffe im biologischen Material ergibt.

45

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen durch Behandlung der Pflanzen mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadionen der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl kann  
5 erfolgreich bei folgenden Pflanzen angewendet werden, wobei auch Pflanzen, die nicht genannt sind, erfolgreich behandelt werden können: Weinreben, Kirschen, Pflaumen, Schlehen, Blaubeeren, Erdbeeren, Zitrusfrüchten (wie Orangen, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie,  
10 rie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, Aronia melanocarpa, Ginkgo biloba handelt.

Pflanzen, die mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadionen, speziell Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl behandelt  
15 wurden zur Steigerung des Gehaltes an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen, oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) können zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und  
20 Tier sowie von Kosmetika verwendet werden.

Aus den erfindungsgemäß behandelten Pflanzen können auch Mittel hergestellt werden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß Trauben  
25 von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen  
30 Inhaltsstoffen auszeichnen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß unter dem Einfluß von mit Acylcyclohexandionen der Formel I, Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl behandelten Pflanzen oder von Teilen dieser Pflanzen  
35 oder aus ihnen hergestellten Produkten (Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte, Säfte etc.)

- (1) die Antioxidative Kapazität *in vitro* (Electron Spin Resonance (ESR), LDL-Oxidation, Total Antioxidant Capacity, NO-Scavenging) verbessert wird;  
40
- (2) eine modulierende Wirkung auf Enzyme, vor allem Enzyme der Signaltransduktion (Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase) auftritt;

- (3) eine Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren (NF-  
kB, AP-1) in Endothelzellen, Lymphocyten und glatten Muskel-  
zellen induziert wird;
- 5 (4) die Regulation der Genexpression von Targetgenen involviert  
~~in die Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen~~ (Cytokine  
~~IL-1 und IL-8, macrophage chemoattractant protein 1~~ (MCP-1),  
~~Adhensionsfaktoren ICAM-1 und VCAM-1~~) moduliert wird.
- 10 (5) eine antiaggregatorische Wirkung induziert wird;
- (6) die Cholesterinsynthese in Hepatocyten gehemmt wird;
- (7) antiproliferative/antineoplastische Effekte bestehen.

15

#### Beispiel 1

Steigerung des Gehaltes an Eriodictyol und Luteoliflavan an jun-  
gen Apfelblättern nach Behandlung mit Prohexadion-Ca

20

Apfelpflanzen der Sorte "Weirouge" wurden unter Klimakammer-BE-  
dingungen kultiviert und mit 250 ppm an Prohexadion-Ca (formu-  
liert als BAS 125 10 W = 10 %iges benetzbares Granulat) bis  
tropfnaß behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behand-  
25 lung wurde von den einzelnen Trieben das jeweils jüngste vollent-  
wickelte Blatt geerntet. Die gefriergetrockneten und gemörserten  
Blätter wurden mit Methanol extrahiert. Aus dem konzentrierten  
Extrakt wurden Flavonoide und verwandte Verbindungen durch HPLC  
analysiert. Die Auftrennung erfolgte dabei an Hypersil ODS (3 µm  
30 Partikelgröße) auf einer Säule von 250 x 4 mm. Die Elution er-  
folgte bei einer Fließrate von 0,5 ml pro Minute, wobei  
Mischungen aus Ameisensäure (5 %ig in Wasser) und Methanol,  
schrittweise im Verhältnis von 95 : 5 bis 10 : 90 (v/v) gestei-  
gert, verwendet wurden. Phenolische Säuren und Flavonole wurden  
35 bei 280 nm detektiert. Flavan-3-ole wurden nach Nachsäulenderiva-  
tisierung mit p-Dimethylaminozimtaldehyd bei 640 nm bestimmt. Me-  
thodische Details bei Treutner et al. (1994), Journal of  
Chromatography A 667, 290 - 297.

40 Das Ergebnis ist in folgender Tabelle dargestellt.

Blätter, die mit Prohexadion-Ca behandelt wurden zeigen eine  
deutliche Erhöhung der Eriodictyol-Konzentration nach 12 bzw. 21  
Tagen.

45

10

Behandlung	Eriodictyol [g/kg Trockenmasse]		Luteoliflavan [g/kg Trockenmasse]	
	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.
5 Kontrolle	0	1	0	70
250 ppm Prohexadion- Ca	17	27	0	34

## 10 Beispiel 2

Herstellung von Probenmaterialien aus behandelnden und unbehandelten Dornfelder-Trauben

- 15 Rebstöcke der Sorte "Dornfelder" wurden zweimal zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Formulierung BAS 125 10W, enthaltend Prohexadion-Ca behandelt. Je Behandlung wurden 1000 g Prohexadion-Ca in 1000 l Spritzbrühe pro ha appliziert.

- 20 Die 1. Ausbringung erfolgte im Entwicklungsstadium 73 noch vor Beginn der Beerenausfärbung, die 2. Ausbringung 10 Tage später.

Bei der Ernte wiesen die unbehandelten und die behandelten Trauben einer ähnlichen Reifegrad auf. Kontrolle unbehandelt: 69°C Oe;

- 25 7,3 g/l Säurebehandelt: 67°C Oe; 7,4 g/l Säure.

Die behandelten Trauben waren geringer pigmentiert. Geschmacklich war kein Unterschied feststellbar.

- 30 Der Weinausbau erfolgte nach gängigen Methoden als Rotwein, d.h. zur besseren Pigmentextraktion stand der Most längere Zeit auf der Maische.

Nach Gefriertrocknung des trübungsfreien Weins wurden aus 100 ml

- 35 unbehandeltem Wein ca. 2,5 g sirupartiger Rückstand und aus dem mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken gewonnenen Wein ca. 2,1 g sirupartiger Rückstand gewonnen.

## Beispiel 3

- 40 Hemmung der Cholesterinbiosynthese in Kulturen primärer Rattenhepatocyten durch Prohexadion-Ca behandelten Dornfelder Wein

45

## Herstellung der Stammlösungen

Vom Lyophilisat der unbehandelten und behandelten Dornfelder Weine wurde eine Menge zwischen 10 und 20 mg exakt abgewogen und mit soviel DMSO versetzt, daß eine Stammlösung von 10 mM Gesamtflavonoiden entstand. Von diesen Stammlösungen wurden unmittelbar vor Testbeginn Verdünnungen im Kulturmedium hergestellt. Die Verdünnungen erfolgten in 10er Schritten zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-8}$  M.

## 10 Herstellung der Hepatocytenkulturen

Primäre Hepatocyten wurden aus den Lebern von männlichen Sprague-Dawley Ratten (240-290 g) mittels Collagenase-Perfusion gewonnen (Gebhardt et al., Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 41: 800 -804 (1991) 1990). Die Kultivierung erfolgte in Collagen-beschichteten Petrischalen (6-well Plates, Greiner, Nürtingen) mit einer Zelldichte von 125.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Williams Medium E mit 10 % Kälberserum. Nähere Angaben insbesondere zum Kulturmedium finden sich bei Gebhardt et al., Cell Biol. Toxicol. 6: 369 - 372 (1990) und Mewes et al., Cancer Res. 53: 5135 - 5142 (1993). Die Kulturen wurden nach 2 h auf serum-freies Medium mit Zusatz von 0,1 µM Insulin gewechselt. Sie wurden nach weiteren 20 h für die Versuche eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in je drei unabhängigen Kulturen von 2-3 Ratten getestet.

25

## Inkubation der Leberzellkulturen mit den Testsubstanzen

Für den Nachweis einer Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese durch die Testsubstanzen wurden die Hepatocytenkulturen insgesamt für 22 h gehalten. Anschließend wurde mit serum-freiem Williams Medium E unter Zusatz von <sup>14</sup>C-Acetat (nur Tracermengen) für 2 h mit den Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei jeder Testserie wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die Methodik ist bei Gebhardt (1991) und Gebhardt, Lipids 28: 613 -619 (1993) detailliert beschrieben. Die Tracermengen von <sup>14</sup>C-Acetat tauschen schnell mit dem intrazellulären Acetyl-CoA Pool aus und ermöglichen deshalb eine störungsfreie Bestimmung des Einbaus von <sup>14</sup>C-Acetat in die Sterolfraction, die zu >90 % aus Cholesterin besteht (Gebhardt, 1993).

40

## Analytik zur Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese

Der Einbau von <sup>14</sup>C-Acetat in die Sterolfraction (nicht-verseifbare Lipide) wurde nach Gebhardt (1991) gemessen. Bei der verwendeten Extraktion mittels Extrelut<sup>®</sup>-Säulen (Merck, Darmstadt) wird das <sup>14</sup>C-Acetat (und daraus in geringer Menge entstehende andere niedermolekulare Metabolite) zu mehr als 95 % abgetrennt. Dieser

## 12

Test kann vergleichende Angaben über die relative Syntheserate von Cholesterin und Vorläufer-Sterolen unter dem Einfluss von Testsubstanzen machen (Gebhardt, 1993).

## 5 Darstellung der Ergebnisse und Statistik

In den Abbildungen sind die gemessenen Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD der Einzelversuche nach Normierung auf die Kontrollwerte (= 100 %) aufgetragen. Die statistische Bewertung erfolgte mit dem Student t-Test; als signifikant wurden Abweichungen mit p-Werten von  $<0,02$  mit (\*) gekennzeichnet.

Visuelle und mikrobielle Überprüfung der Qualität der Hepatocytenkulturen

15

Alle verwendeten Kulturen wurden vor und nach der Testinkubation visuell am Mikroskop auf Kontamination mit Mikroorganismen und auf die Integrität der Zellmonolayer überprüft. Bei keiner der Proben wurde eine erkennbare Veränderung der Zellmorphologie (insbesondere bei den höheren Konzentrationen) beobachtet. Dies schließt eine Beeinflussung der Testergebnisse durch zytotoxische Wirkungen der Testsubstanzen weitgehend aus.

Die bei allen Kulturen routinemäßig durchgeführten Sterilitäts-  
tests ergaben keinerlei Hinweise auf eine Kontamination mit Mikroorganismen.

## Ergebnisse

Der unbehandelte Dornfelder Wein zeigte keinerlei Wirkungen auf die Cholesterinbiosynthese. Dagegen wurde die Cholesterinsynthese durch Proben von mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken hergestelltem Wein signifikant inhibiert. Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M betrug die Hemmwirkung ca. 60 % und bei  $10^{-4}$  M annähernd 100 %.

40

45

# Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen

## 5 Zusammenfassung

Verfahren zur Erhöhung des Flavonoidgehalts in Pflanzen dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen mit wachstumsregulierenden Acylcyclohexadienonen gemäß Formel I behandelt werden.

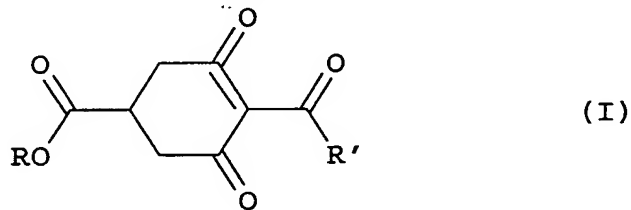
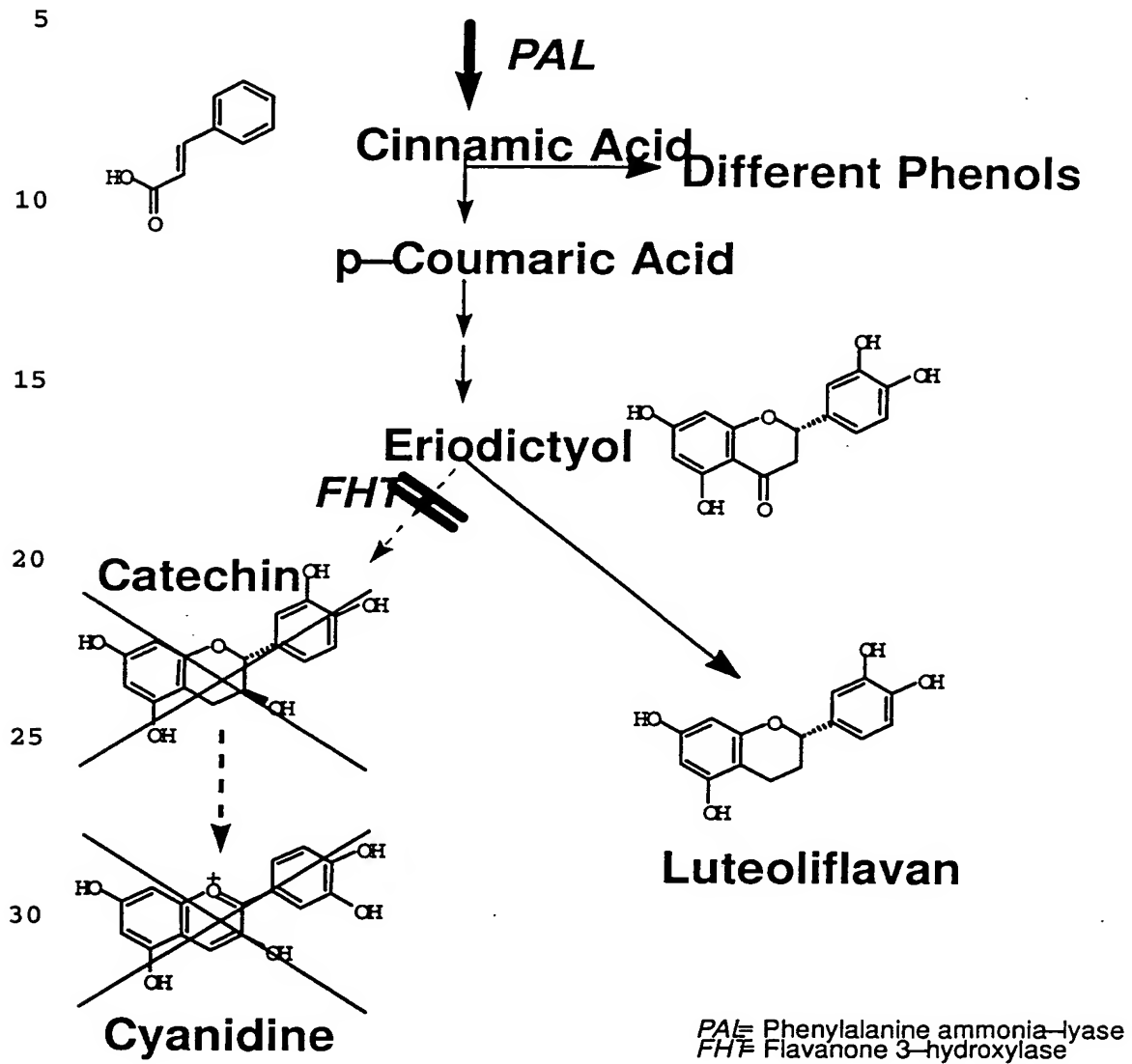




Abbildung 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**